

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA
Facultad de Psicología



Trabajo de Fin de Grado

**ALTERACIONES MOTORAS, COGNITIVAS Y
EMOCIONALES EN LA ENCEFALOMIELITIS
AUTOINMUNE EXPERIMENTAL**

Autora: Cristina Sánchez Morales
Director: Dr. Luis Javier Santín Núñez

Málaga, diciembre de 2015

Índice

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	1
MATERIAL Y MÉTODOS	5
Animales	5
Inducción de la EAE	5
Diseño experimental	6
Evaluación conductual	7
- <i>Test de actividad en rodillo</i>	8
- <i>Laberinto en Y</i>	8
- <i>Reconocimiento de objetos con desplazamiento espacial</i>	10
- <i>Laberinto en cruz elevado</i>	12
Análisis estadísticos	13
RESULTADOS	13
Evolución de los síntomas clínicos	13
Actividad locomotora reducida	15
Afectación de la memoria espacial de trabajo	15
Afectación de la memoria espacial a corto plazo	17
Incremento del nivel de ansiedad	19
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIÓN	24
REFERENCIAS	25

1. RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neuroinflamatoria y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC). Actualmente, el modelo animal experimental más adecuado para la EM humana es la encefalomiелitis autoinmune experimental (i.e. EAE), la cual utilizamos en nuestro estudio para la evaluación de las alteraciones motoras, cognitivas y emocionales de nuestros ratones con curso remitente-recurrente. A día de hoy, el estudio del deterioro cognitivo en la EAE es reciente y escaso, siendo necesario realizar estudios pre y post-sintomáticos. En este sentido, analizamos de forma experimental el grado de afectación durante estadios más avanzados (fases de brote, remisión y estabilización). En conjunto, nuestros resultados indicaron que nuestros ratones EAE presentaron: alteraciones motoras, incremento de la conducta ansiosa, y déficits de memoria espacial de trabajo y a corto plazo.

Palabras clave: cognición, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmune experimental, EAE, curso remitente-recurrente, evaluación conductual.

2. INTRODUCCIÓN

La Esclerosis múltiple (EM) se considera una enfermedad degenerativa, progresiva y desmielinizante de origen autoinmune, que cursa con la aparición de lesiones inflamatorias focales (placas escleróticas) en los axones de las neuronas del cerebro y de la médula espinal, que como consecuencia, impide el funcionamiento normal de las fibras nerviosas (Martin et al., 1992; Steiman, 1996; Compston y Coles, 2008; Lassmann et al., 2007). A pesar de que su descubrimiento se remonte al año 1868, de la mano de Charcot, su etiología y patología son aún desconocidas (Milo y Miller, 2014).

Constituye la causa más frecuente de incapacidad de origen neurológico entre los jóvenes adultos (Bártulos et al., 2014). En 2013, se estimó que alrededor de más de 2 millones de personas fueron diagnosticadas en todo el mundo y sólo en Europa 500.000 fueron las afectadas. España, con 46.000 diagnosticados, se considera el sexto país europeo con mayor prevalencia (Browne et al., 2014), encontrándose sólo en Málaga entorno a 2.000 casos diagnosticados (Fernández, 2014). Actualmente, la incidencia mundial está en aumento, de los 2,1 millones de afectados en 2008 a los 2,3 millones en 2013; siendo las mujeres diagnosticadas con mayor frecuencia que los hombres, en una relación de 3 a 1 (Fernández et al., 2014).

La EM es causada por la sobreactivación del sistema inmunológico (SI), y se caracteriza principalmente por una patología neuroinflamatoria, que es seguida de un proceso neurodegenerativo. Este sistema de defensa, en colaboración con las células T y a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), detecta posibles antígenos en los componentes de la mielina. De esta forma, las células T sobreactivadas migran al SNC desencadenando anticuerpos contra la glicoproteína oligodendrocitaria de la mielina (MOG, de su denominación en inglés, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*) o contra la proteína básica de la mielina (Martínez, 2013 y Sánchez, 2008); atacando al SNC como si de un virus se tratara. En la Esclerosis múltiple, las células T sobreactivadas más representativas son los linfocitos CD4+, que estos a su vez se diferencian en tres linfocitos cooperadores del SI: Th1, Th2 y Th17; siendo Th1 y Th17 los linfocitos más relevantes en la EM y en la EAE (McFarland y Martin, 2007; Lovett-Racke et al., 2010).

La Encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) es el modelo animal más empleado en el estudio de la Esclerosis múltiple (Rangachari y Kuchroo, 2013), ya que al relacionarse con la sobreactivación de los linfocitos T CD4+ (Th1 y Th17), sus mecanismos inmunológicos conducen a similares características patológicas de la EM: inflamación, desmielinización, pérdida axonal y gliosis (Constantinescu et al., 2011; McCarthy et al., 2012).

Los orígenes del modelo EAE, se remontan a la primera inducción inflamatoria sobre la médula espinal en conejos, llevada a cabo por Koritschoner y Schweinburg en el año 1920 (Koritschoner y Schweinburg, 1925); a partir de entonces, ha sido inducida en múltiples especies, incluyendo a primates y roedores.

En cuestión al desarrollo de la EAE, el modelo puede inducirse de dos maneras: de forma activa o de forma pasiva. En la forma activa se administran péptidos o proteínas de la mielina, como la glucoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG), que generan la respuesta citotóxica-proinflamatoria y el consecuente proceso de desmielinización (Steinman, 2007; García-Díaz y Estivill-Torrús, 2008; Mannara et al., 2012). En la forma pasiva se realiza la transferencia de células T específicas contra antígenos de la mielina, que conllevan al mismo resultado de desmielinización (Mendel et al, 1995; Stefferl et al, 2000). En nuestro estudio se empleó la inducción activa de la EAE, considerada la más sencilla y eficaz para producir resultados rápidos y robustos (Mannara et al, 2012).

En cuestión al curso que pueda desarrollarse tanto en la EM como en la EAE, encontramos cuatro tipos de evolución con un alto grado de heterogeneidad (figura 1):

- **Curso remitente-recurrente (RR).** El más frecuente y detectado en el 85% de los pacientes de EM (McKay et al., 2015). Se caracteriza por presentar una fase inicial donde no suelen aparecer síntomas detectables, seguida de una fase de brote en la que se detectan síntomas agudos durante varios días o semanas. Esta fase de brote es seguida de una recuperación espontánea, conocida como fase de remisión, y finalmente por una fase de estabilización de los síntomas. De esta forma se obtiene un curso intermitente.
- **Curso progresivo primario (PP).** El 10% de los pacientes presentan un inicio y empeoramiento lento y continuo, en ausencia de remisiones y brotes definidos (Lublin y Reingold, 1996).
- **Curso progresivo recidivante (PR).** Se presenta con una menor prevalencia (Tullman et al., 2004), y está caracterizada por una forma atípica, después de la aparición de la enfermedad. A diferencia de los PP, muestran brotes agudos con o sin recuperación completa. No obstante, los períodos de remisión suelen ser progresivos de forma continua.
- **Curso progresivo secundario (PS).** Aparece entre un 30-50% de los pacientes, después de los 10-15 años de evolución del curso RR (Gold y Rieckmann, 2000). Caracterizado por un empeoramiento gradual con o sin recaídas ocasionales, remisiones poco relevantes y fases de estabilidad (Chiaravalloti y DeLuca, 2008; Rommer y Stüve, 2013).

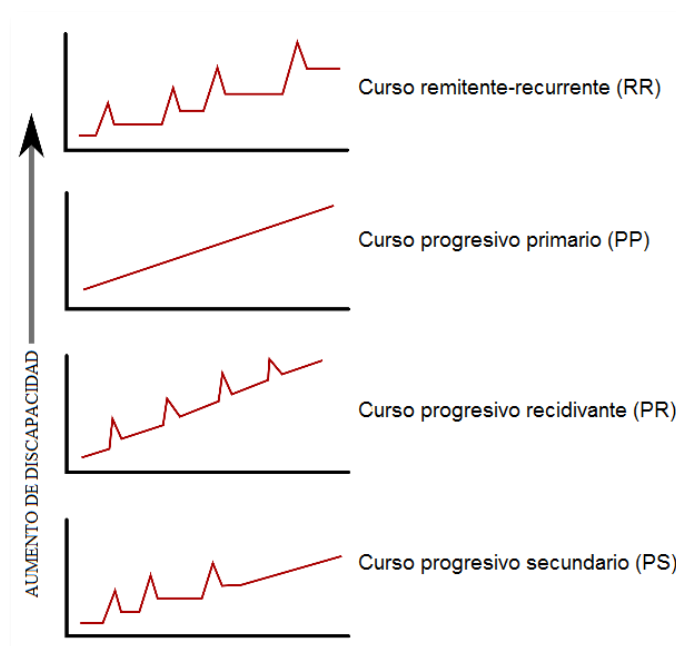


Figura 1. Curso clínico de la Esclerosis múltiple.

El modelo de la EAE nos permite inducir en los animales la mayoría de los síntomas clínicos de la EM, como la disminución progresiva de las funciones motoras, cognitivas y emocionales (Miller, 2012); las cuales derivan, en la mayoría de los casos, a una incapacidad permanente (Steinman, 2007; Dutra et al., 2013).

En cuanto a la afectación motora y sensorial, se suelen observar problemas de coordinación, dolor muscular y trastornos visuales (Ziemssen, 2011). De entre las alteraciones cognitivas principales, se pueden presentar problemas en la memoria (Muhler et al., 2014; Hulst et al., 2015), la atención (Paul et al., 1998; Jongen et al., 2012), las funciones ejecutivas (Foong et al., 1997; Jongen et al., 2012), la velocidad de procesamiento cognitivo (Rao et al., 1989; Parmenter et al., 2007) y la capacidad visoespacial (Longoni et al., 2015). Además de las alteraciones emocionales, de las cuales un 35% de los pacientes suelen sufrir problemas de ansiedad (Brenner et al., 2014) y un 50% de depresión (Siegert y Abernethy, 2005).

No obstante, la alta comorbilidad de la EM (presencia de una o más condiciones o enfermedades concurrentes) origina importantes retrasos en la realización de los diagnósticos y la aplicación de los tratamientos necesarios (Marrie et al., 2015); siendo la depresión y la ansiedad dos de las cinco comorbilidades más predominantes (Acharjee et al., 2013). Sin embargo, en la actualidad aún no existen tratamientos eficaces para la presencia de los síntomas cognitivos, emocionales y motores de EM y EAE.

Dado el alto impacto disfuncional de la discapacidad y los ineficaces tratamientos que actualmente existen (Acharjee et al., 2013), hemos evaluado las alteraciones motoras, cognitivas y emocionales, con el objetivo de obtener información sobre el desarrollo de la enfermedad en el modelo EAE con curso remitente-recurrente. Para ello, hemos utilizado una serie de pruebas conductuales para evaluar la afectación de la coordinación motora, la memoria y la ansiedad. Una vez identificados estos déficits, nuestros resultados serán de utilidad para la evaluación futura de la eficacia terapéutica de la administración de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo, estudios que se están desarrollando en el grupo de investigación con el que se realizó este trabajo de fin de grado.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Todos los experimentos se realizaron empleando ratones hembras (fondo genético C57BL/6J x 129X1/SvJ) con 6-8 semanas de edad, criados y mantenidos en las instalaciones de la Unidad de Experimentación Animal de la Universidad de Málaga. Siete ratones hembras fueron asignadas al grupo experimental de inducción de la enfermedad (grupo EAE), y nueve ratones hembras al grupo control (N=16). Todos los animales fueron marcados para su identificación, siendo alojados en grupos de 3-4 ratones por jaula. Durante la realización del experimento, los animales se estabularon en condiciones estándar, disponiendo de comida y agua “*ad libitum*”, y un ciclo constante de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea 2010/63/EU, 90/219/CEE, y Regulación (EC) nº1946/2003, siendo aprobados por el comité ético de la Universidad de Málaga (CEUMA: 2012-0006-A; 2012-0007-A) y desarrollados siguiendo la normativa Española (Real Decreto 53/2013 y 178/2004, Ley 32/2007 y 9/2003, y Decreto 320/2010). Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical para la extracción de sangre y diversos tejidos; tales como cerebro, médula y bazo. Las muestras de sangre así como los tejidos obtenidos, fueron utilizados para el posterior análisis inmunohistoquímico y la obtención del perfil inflamatorio de citoquinas; estudios no incluidos en este trabajo de fin de grado.

3.2. Inducción de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE)

La inducción de la EAE se realizó empleando la inmunización activa: se administró por vía subcutánea 50 µl de una emulsión en cada lado de la cola (100 µl en total), conteniendo 200 µg de la proteína de la mielina del oligodendrocito (MOG35-55; *del inglés myelin oligodendrocyte glycoprotein*, Biomatik Corporation, Cambridge, Canadá) y de coadyuvante de Freund (CFA, Sigma-Aldrich Química S.A, Madrid, España); realizándose de nuevo la inmunización a los 7 días post-inmunización (dpi). La toxina pertussis (500 ng/ratón, TocrisBioscience, Bristol, Reino Unido) fue inyectada el día de la inmunización (0 dpi), 48 horas después (2 dpi), y repetida a los 7 y 9 días. Como grupo control se emplearon un total de 9 ratones hembras, las cuales recibieron 40 µl de CFA y toxina pertussis, repetida la administración de CFA a los 7 dpi. El curso de la enfermedad EAE se definió como remitente-recurrente, caracterizado por presentar dos o más brotes seguidos de los correspondientes períodos de remisión.

La puntuación del grado de afectación se obtuvo diariamente en cada uno de los ratones, según una escala de 0 a 5 puntos establecida en nuestro laboratorio y basada en el protocolo descrito por Hooke Laboratories (2008-2014) y publicaciones previas (Miller et al., 2007; Acharjee et al., 2013) (tabla 1).

Tabla 1. Puntuación de la EAE

Puntuación	Síntomas Clínicos
0.0	Saludable. La cola del ratón tiene tensión y está erecta. Cuando el ratón está caminando no hay inclinación de la cabeza.
0.5	El final de la cola está flácido, la cola tiene tensión a excepción de la punta. No obstante, la cola sigue moviéndose, con un considerable esfuerzo muscular.
1.0	Cola flácida, no se observan signos de movimiento de la cola. Las patas traseras presentan una inusual separación.
1.5	Cola flácida e inhibición de las patas traseras. Mantienen un movimiento tambaleante cuando caminan.
2.0	Cola flácida y debilidad en las patas traseras.
2.5	Cola flácida y arrastre de las patas traseras.
3.0	Cola flácida y parálisis completa de las patas traseras.
3.5	Cola flácida y parálisis completa de las patas traseras, con un movimiento circular constante alrededor de la jaula, al no ser capaz de enderezarse.
4.0	Cola flácida, parálisis completa de las patas traseras y parálisis parcial de las patas delanteras.
4.5	Parálisis completa de las patas traseras, y parálisis parcial de las patas delanteras, sin presentar movimiento alrededor de la jaula. El ratón no está alerta.
5.0	El ratón está rodando de forma espontánea en la jaula (se recomienda la eutanasia).

3.3. Diseño experimental

Ratones hembras de 6-8 semanas de edad fueron divididas en dos grupos: grupo control y grupo EAE. Cuatro días antes de la inmunización se realizó la primera evaluación conductual, denominada fase basal (en ausencia de síntomas clínicos). Posteriormente, se procedió a la inducción de la EAE en el grupo experimental y en el grupo control (día 0). A partir del día 19 dpi, se realizó una segunda evaluación conductual (19-21 dpi), que correspondió con la

fase de brote de la EAE (aparición de los primeros síntomas de la enfermedad). La tercera evaluación conductual se realizó a los 41-43 dpi, la cual coincidió con la fase de estabilización. Finalmente, los ratones se sacrificaron en el día 57 (figura 2).

Las pruebas de comportamiento que se llevaron a cabo fueron: el test de actividad en rodillo (rotarod), el laberinto en Y, el test de reconocimiento de objetos con desplazamiento espacial y el laberinto en cruz elevado; siendo la prueba de rotarod y el laberinto en Y, las que se administraron conjuntamente en un mismo día del experimento. Con estas pruebas se evaluaron la coordinación motora, la memoria espacial de trabajo (MT), la memoria espacial a corto plazo (MCP) y la emisión de conductas relacionadas con la ansiedad, respectivamente.

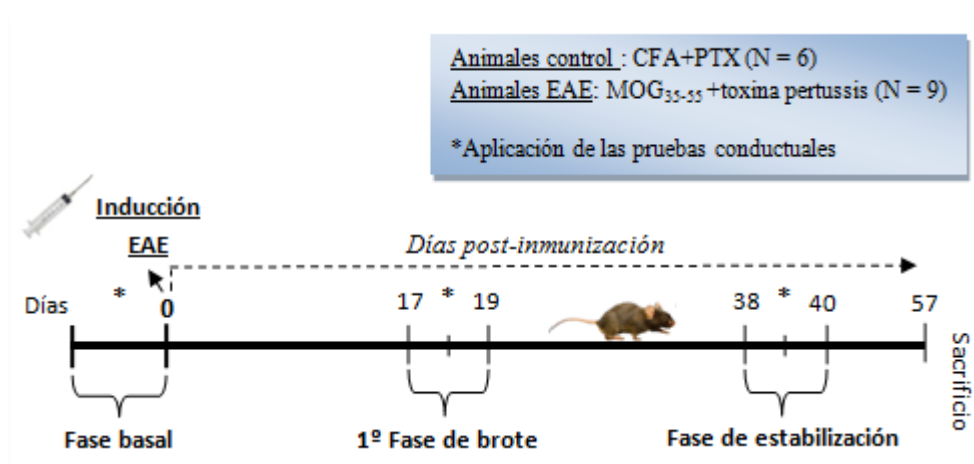


Figura 2. Diseño experimental para el estudio de la esclerosis múltiple en el modelo animal de EAE. Se detalla la planificación temporal de la aplicación de las pruebas conductuales.

3.4. Evaluación conductual

Antes de iniciarse la evaluación conductual en la fase basal, todos los animales fueron manipulados durante 5 minutos por el experimentador y habituados a las condiciones ambientales de la sala experimental. Las pruebas conductuales se realizaron en diferentes días y se administraron siguiendo un orden inverso a la capacidad de la prueba para generar estrés en los ratones (figura 2). Una vez finaliza cada una de las pruebas, los animales fueron depositados en su jaula experimental, manteniéndose en la sala de estabulación hasta su uso posterior. Las pruebas fueron repetidas a la misma hora de la mañana (09:00 a.m.), y una vez realizadas de forma individual, se limpiaron con etanol al 70% para evitar que los olores y las feromonas interfirieran en los resultados. Todas las tareas fueron administradas tanto al grupo experimental de EAE como al grupo control.

3.4.1. Test de actividad en rodillo (Rotarod):

El test de actividad en rodillo se utilizó para evaluar las habilidades de coordinación motora en los animales. El tiempo de permanencia en el rodillo constituye una medida de su coordinación, condición física y planificación motora (Méndez et al., 2008; Sampedro-Piquero et al., 2013).

Este test consiste en un rodillo giratorio de 3 cm de diámetro con una velocidad constante de 4 rpm, que se aplicó durante 2 minutos. Cuatro ratones por tanda fueron colocados en el rodillo para evaluarlos de manera simultánea (figura 3), registrándose la latencia desde el inicio de la prueba hasta la caída del ratón en la placa inferior, la cual detiene el temporizador.

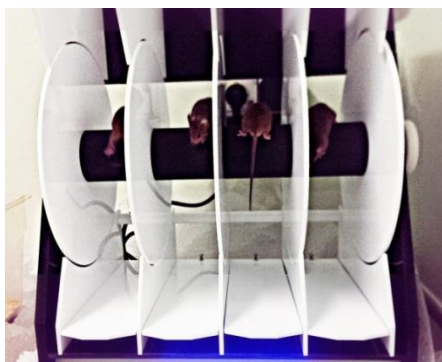


Figura 3. Test de actividad en rodillo (Rotarod).

3.4.2. Laberinto en Y:

El laberinto en forma de “Y” es una prueba de comportamiento para evaluar la memoria de trabajo espacial, en la cual el animal debe elegir y explorar cada uno de los brazos del laberinto (Sarnyai et al, 2000).

El aparato está compuesto por tres brazos cerrados (40 cm de largo, 14 cm de alto y 4,5 cm de ancho), formando entre ellos un ángulo de 120° con un área central triangular equilátera (figura 4). Los ratones fueron colocados en el extremo distal de un mismo brazo, permitiéndoles libertad de movimiento durante 8 minutos.

El ratón tiende a explorar en su totalidad un lugar desconocido, de tal forma que si esta prueba está formada por 3 brazos, los visitará siguiendo un orden que le permita explorar todos ellos con una misma frecuencia. Si el ratón visita uno de los brazos, deberá memorizar su localización para poder explorar después a los otros dos que le quedan.

Para medir la capacidad de memoria de trabajo, se registró el orden de los brazos visitados en un ensayo y se calculó el número de alternancias espontáneas que cada uno de los animales

realizó durante ese mismo ensayo. A continuación, se calculó el porcentaje de alternancia espontánea de cada animal en todo el ensayo, dividiendo el número de alternancias correctas por el número de entradas a los brazos menos 2 (figura 5) (Maurice et ál., 1994; Mamiya y Ukai, 2001). Se consideró que un ratón había visitado un brazo del laberinto cuando la totalidad de las extremidades de las patas traseras se encontraba en un mismo brazo del laberinto.

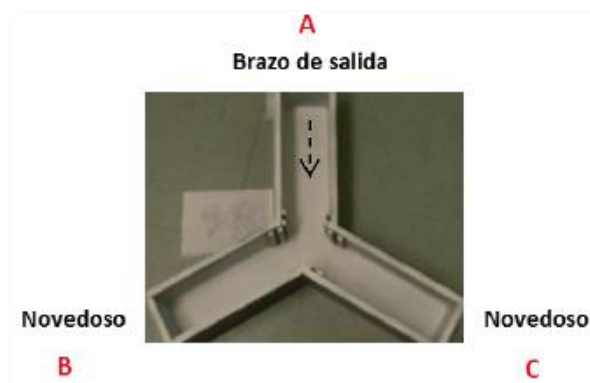


Figura 4. Laberinto en Y. Para facilitar el cálculo de alternancia, se definieron los brazos en A, B y C; asignadas las letras de forma arbitraria.

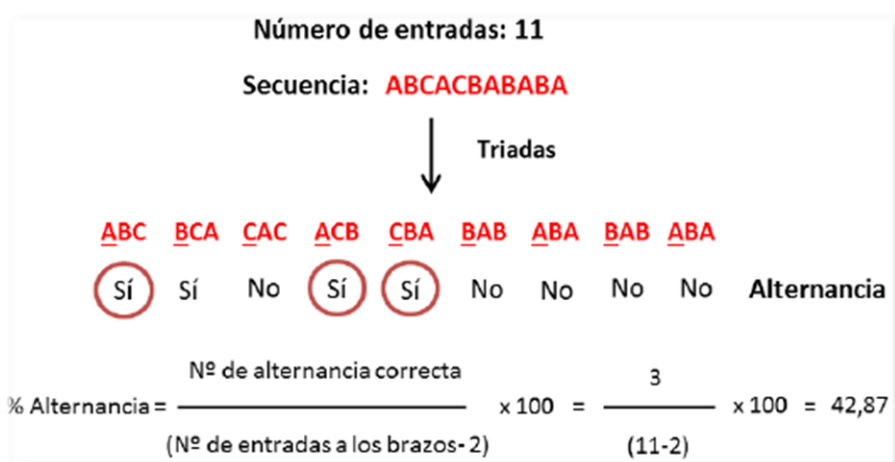


Figura 5. Ejemplo y fórmula para calcular el porcentaje de alternancias espontáneas en el laberinto en Y. Si el animal realizara las siguientes entradas en los brazos (ACB, CA, B, C, A, CAB, C, A), habría efectuado 27 entradas en los brazos de las cuales 3 habrían sido alternancias correctas. Se calculó el número total de alternancias realizadas en cada uno de los ratones durante el ensayo, aplicándose la fórmula mostrada.

Además del cálculo del porcentaje de alternancia espontánea, se tuvieron en cuenta otras variables dependientes como la velocidad media (cm/s) y la distancia total recorrida (cm) (locomoción), obtenidas con ayuda de un sistema de registro y evaluación de la conducta animal (Ethovision XT5.0, Noldus Information Technoly, Waningen, Países Bajos).

3.4.3. Reconocimiento de objetos con desplazamiento espacial:

Esta prueba conductual permite evaluar la memoria de reconocimiento espacial. Mediante esta tarea, se puede evaluar la memoria a largo plazo y a corto plazo, dependiendo del intervalo entre el ensayo de muestra y el de recuerdo (Ennaceur, 2010; Antunes y Biala, 2012), siendo la memoria espacial a corto plazo la que se evaluó en nuestro estudio.

Este test consiste en un área abierta cuadrada con una superficie total de 50 cm x 50 cm, rodeada de paredes verticales con una altura de 38 cm (Figura 6).

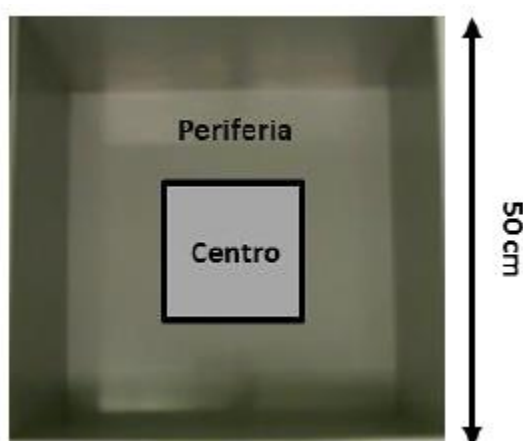


Figura 6. Imagen del test de campo abierto.

El protocolo para la administración de la prueba consistió en tres fases: una fase de habituación con duración de 5 minutos (figura 7.a), un descanso de 5 minutos, una fase de muestra con duración de 5 minutos (7.b), un intervalo entre ensayos de 90 minutos; y por último, una fase de recuerdo con duración de 5 minutos (7.c). En cada uno de los ensayos, el experimentador situó al animal en el centro del campo abierto y se grabó cada sesión con ayuda de una videocámara digital.

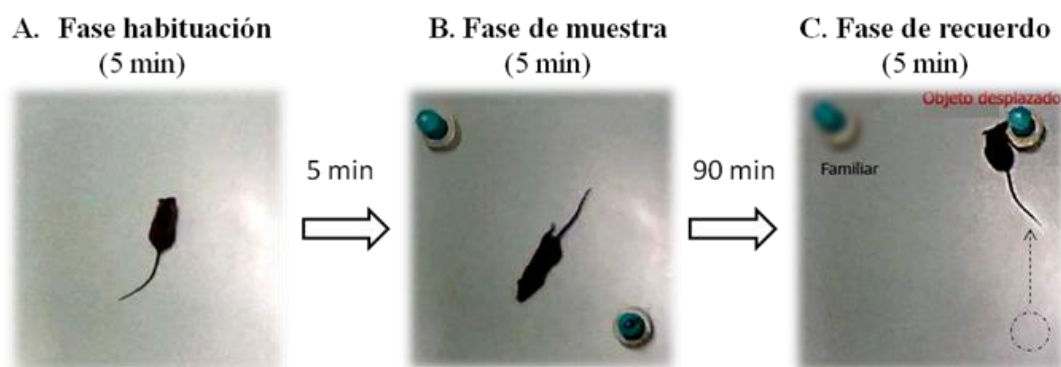


Figura 7. Representación del procedimiento de la prueba de reconocimiento de objetos, con desplazamiento espacial y ubicación de los objetos.

Fase de habituación (Campo abierto):

Durante esta fase, se situó al animal en el centro del laberinto sin la presencia de ningún objeto, donde permaneció durante 5 minutos (figura 7.a). La sesión fue grabada, y posteriormente, con el programa Ethovision XT5.0, se registró las siguientes variables espacio-temporales: distancia total recorrida (cm), velocidad media total (cm/s) y tiempo de permanencia en la región central (s). Para cuantificar el tiempo de permanencia en el centro del laberinto, se dividió el campo abierto en 2 regiones imaginarias: una, que correspondió a la zona externa (separado a 8,3 cm de las paredes) y otra, a la zona interna (a 8,3 cm del otro rectángulo) (figura 6).

Fase de muestra:

En esta segunda fase, se situó al animal en el mismo laberinto frente a dos objetos idénticos situados en las dos esquinas opuestas a la localización del animal (Objeto 1 y Objeto 2) (figura 7.b). La sesión fue grabada, y posteriormente, con el programa Ethovision XT5.0, se registró la distancia total recorrida (cm) y la velocidad media (cm/s). También se realizó un registro observacional de la frecuencia y el tiempo de exploración de los dos objetos presentes en el laberinto. Se consideró que un animal se encontraba explorando un objeto cuando el ratón realizaba las siguientes conductas: orientar el hocico hacia el objeto, olerlo y/o tocar el objeto con las patas. Sin embargo, no se registró la conducta de exploración cuando el ratón subía hacia el objeto y se sentaba (Clark et al., 2000; Hale y Good 2005; Bilsland et al., 2008; Goulart et al., 2010; Schindler et al., 2010).

Fase de recuerdo:

En esta tercera y última fase, uno de los objetos presentados en el ensayo anterior se desplazó al lado opuesto del campo (Objeto desplazado), permaneciendo el otro objeto en el mismo lugar que en la fase de muestra (Objeto familiar) (figura 7.c). La selección del objeto desplazado se estableció de forma aleatoria. Se registraron las mismas variables y conductas, previamente descritas en la fase de muestra.

Con los resultados de la exploración de los objetos de cada uno de los animales, se calculó el índice de discriminación (ID), el cual permite obtener la diferencia entre el tiempo de exploración del objeto desplazado y el tiempo de exploración del objeto familiar, y constituye una medida del grado de recuerdo de la posición de los objetos (figura 8).

$$ID = \frac{(T_{desplazado})}{(T_{desplazado} + T_{familiar})}$$

Figura 8. Fórmula para calcular el índice de discriminación. $T_{desplazado}$ es el tiempo de permanencia explorando el objeto desplazado y $T_{familiar}$ es el tiempo de exploración del animal sobre el objeto no desplazado, durante la fase de recuerdo del experimento.

3.4.4. Laberinto en Cruz Elevado:

Esta prueba permite evaluar la conducta de ansiedad en los ratones mediante la proporción del tiempo que el animal ha dedicado a la exploración de los brazos abiertos y cerrados (Lister, 1987). El laberinto está formado por dos brazos cerrados (30 x 5 cm) rodeados por paredes verticales de 15cm de altura, y dos brazos abiertos (30 x 5 cm) desprotegidos ante una posible caída desde la plataforma al suelo; ambos elevados del suelo a una altura de 38,5 cm y cruzados por un ángulo de 90° (figura 9). Cada animal fue situado en el centro y se registró su conducta con una videocámara digital durante 5 minutos.

Durante el ensayo, el ratón tiene la opción de poder explorar libremente los brazos del laberinto, siendo los cerrados los lugares seguros y los abiertos los lugares ansiogénicos y peligrosos. Los ratones muestran una tendencia natural a preferir los brazos cerrados, ya que se consideran más seguros que los abiertos (Lister, 1987; Rodgers, 1997).



Figura 9. Laberinto en cruz elevado

Con ayuda del sistema de registro y análisis de la conducta animal Ethovision XT5.0, se obtuvieron y analizaron las siguientes variables: la distancia total recorrida (cm), la velocidad media total (cm/s), y el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (s), cerrados (s) y en el centro del laberinto (s). Se consideró que el animal había entrado en un brazo, cuando las cuatro patas se encontraron en un mismo brazo del laberinto.

El tiempo de exploración de los brazos abiertos y cerrados se empleó para calcular el índice de ansiedad: tiempo de permanencia en los brazos abiertos dividido por el tiempo total en brazos abiertos y cerrados (figura 10) (Malleret et al., 1999; Santin et al., 2009). El tiempo de permanencia en el centro no se tuvo en cuenta para el cálculo del índice de ansiedad, ya que se consideró como zona neutra del laberinto.

$$IA = \frac{tiempo\ en\ brazos\ abiertos}{tiempo\ en\ brazos\ abiertos + brazos\ cerrados}$$

Figura 10. Fórmula para calcular el índice de ansiedad (IA).

3.5. Análisis Estadísticos

Todas las variables obtenidas fueron analizadas mediante un ANOVA de medidas repetidas de dos vías (“Tratamiento” Vs “Día”, siendo tratamiento (Control-EAE) y Día (medida repetida)). Cuando el ANOVA mostró diferencias estadísticamente significativas, se empleó la diferencia mínimamente significativa de Fisher (LSD) para realizar el análisis *post hoc*. Los resultados de las gráficas se consideraron estadísticamente significativos cuando alcanzaba una probabilidad de $p \leq 0,05$, y fueron expresados con el valor medio \pm el error estándar de la media (SEM). Los análisis estadísticos se realizaron con el software STATISTICA 7.1 (StatSoftInc, Oklahoma, Estados Unidos).

4. RESULTADOS

4.1. Evolución de los síntomas clínicos de EAE

El curso obtenido de la enfermedad, siguiendo el protocolo de inmunización, fue remitente-recurrente; caracterizado por presentar tres brotes sintomatológicos, de entre los cuales aparecieron dos periodos de remisión, y terminando con una fase de estabilización. La aparición de los síntomas clínicos de la enfermedad tuvo lugar en los días 14-16 post inducción (dpi), obteniendo la mayoría de los animales el grado 0.5 de puntuación clínica, mostrando síntomas de flacidez al final de la cola.

En el día 17 después de la inmunización, los animales alcanzaron el grado 1 de puntuación en la escala de afectación, caracterizado por presentar síntomas de debilidad, sin movimiento en la totalidad de la cola (figura 17). De esta manera, se definió la primera fase de brote, al obtener la puntuación ≥ 1 durante al menos dos días consecutivos (Hammer et al., 2015). A partir de este momento, los animales continuaron incrementando su grado de afectación hasta alcanzar una puntuación de 2 el día 24 después de la inmunización (debilidad en las extremidades y una aparente flacidez en la cola).

La fase de remisión se inició el día 27 después de la inmunización, ya que los ratones disminuyeron su puntuación ≥ 0.5 grados durante al menos dos días consecutivos. En esta fase, presentaron una puntuación media de 1.5 en la escala de EAE, con flacidez en la cola e inhibición en las patas traseras, manteniendo un movimiento tambaleante cuando caminaban. Seguidamente, los ratones mostraron una segunda fase de brote en el día 29 con 2 grados de puntuación, y una segunda fase de remisión en el día 31 con 1.5 grados de puntuación.

Posteriormente, los animales volvieron a manifestar una tercera fase de brote que se inició el día 34 dpi, presentando el grupo EAE una puntuación media de 2 grados en la enfermedad, que se mantuvo estable hasta el final del registro de los síntomas (fase de estabilización). Esta última fase se pudo observar a partir del día 38 después de la inmunización.

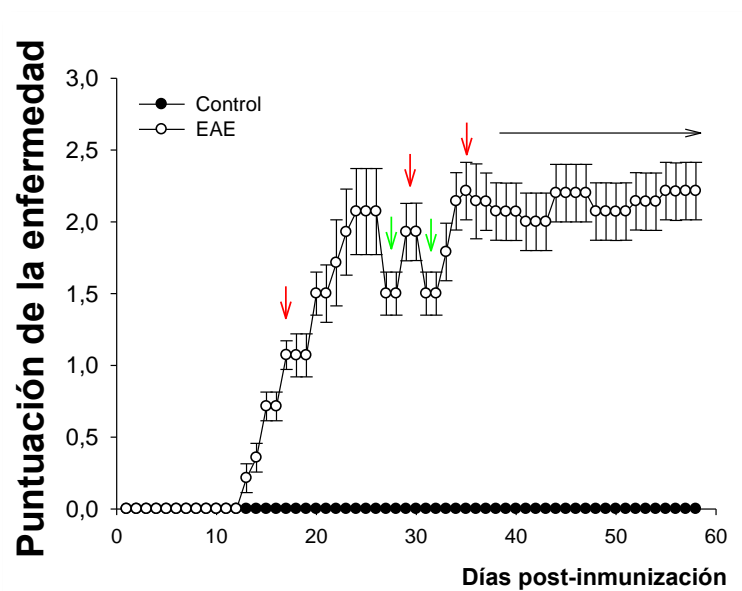


Figura 11. Evolución de la EAE. Las flechas rojas indican las fases de brote, las flechas verdes señalan las fases de remisión y la flecha negra horizontal indica la fase de estabilización. Los momentos de la realización de las pruebas de comportamiento corresponden con la fase de brote inicial (19-21 dpi) y la fase estabilización (38 dpi).

4.2. Actividad locomotora reducida en el grupo EAE

Para estudiar la alteración motora inducida por la enfermedad, se analizó el tiempo que permanecieron los ratones en el rotarod (figura 12). El ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto del tratamiento ($F_{1, 14} = 12,266$; $p \leq 0,05$) y un efecto de la variable “día” ($F_{2, 28} = 4,105$; $p \leq 0,05$), sin observarse una interacción estadísticamente significativa ($F_{2, 28} = 2,496$; $p \geq 0,05$). Los análisis post hoc mostraron que el grupo EAE pasó menos tiempo que el grupo control en el rotarod durante la fase de brote y de estabilización (LSD: $p \leq 0,05$).

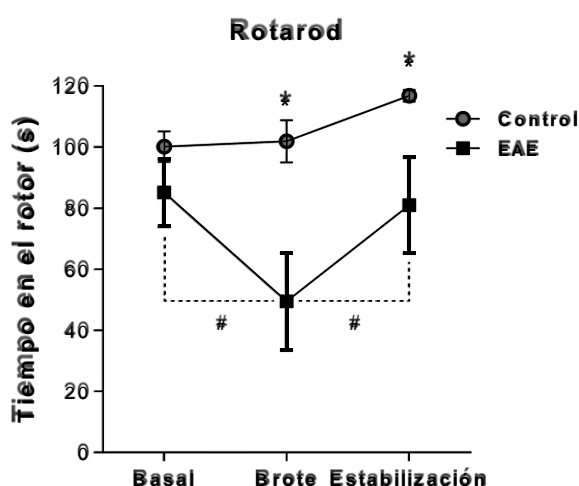


Figura 12. Tiempo de permanencia en el rotarod. Medias \pm SEM. El grupo EAE permaneció un menor tiempo en rodillo durante las fases de brote y de estabilización. LSD: diferencia entre el grupo EAE y control (* $p \leq 0,05$), y entre las fases basal, de brote y de estabilización (# $p \leq 0,05$).

4.3. Afectación de la memoria espacial de trabajo en el grupo EAE

Los resultados del ANOVA mostraron un efecto del tratamiento, indicando que los ratones EAE exhibieron un menor porcentaje de alternancia espontánea en el laberinto en Y ($F_{1, 14} = 10,695$; $p \leq 0,001$), tanto en la fase de brote como en la fase de estabilización (LSD: $p \leq 0,05$). No existió un efecto del día ($F_{2, 28} = 1,328$; $p \geq 0,05$), ni interacción entre ambas variables ($F_{2, 28} = 1,809$; $p \geq 0,05$) (figura 13.a).

Con respecto a la locomoción (distancia total recorrida (cm)), el ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto del tratamiento ($F_{1, 14} = 5,703$; $p \leq 0,05$), siendo el grupo EAE el que obtuvo una reducción de la distancia total recorrida durante la fase de brote (LSD: $p \leq 0,05$), en comparación con el grupo control (figura 13.b). Además, la variable “día” mostró un efecto significativo ($F_{2, 28} = 5,435$; $p \leq 0,05$), disminuyendo la locomoción de los ratones EAE en la fase de brote con respecto a la basal (LSD: $p \leq 0,05$), y aumentando significativamente en la

fase de estabilización con respecto a la fase de brote (LSD: $p \leq 0,05$). Sin embargo, no se observó una interacción estadísticamente significativa ($F_{2, 28} = 1,224$; $p \geq 0,05$) entre ambas variables.

En relación al número de entradas en el laberinto en Y, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los ratones EAE con respecto al grupo control ($F_{1, 14} = 0,4864$; $p \geq 0,05$). No obstante, los animales de ambos grupos mostraron un del efecto día ($F_{2, 28} = 9,984$; $p \leq 0,05$) con una disminución del número total de entradas en los brazos del laberinto en la fase de brote en comparación a la fase basal (LSD: $p \leq 0,05$); no existiendo una interacción estadísticamente significativa ($F_{2, 28} = 0,233$; $p \geq 0,05$) (figura 14).

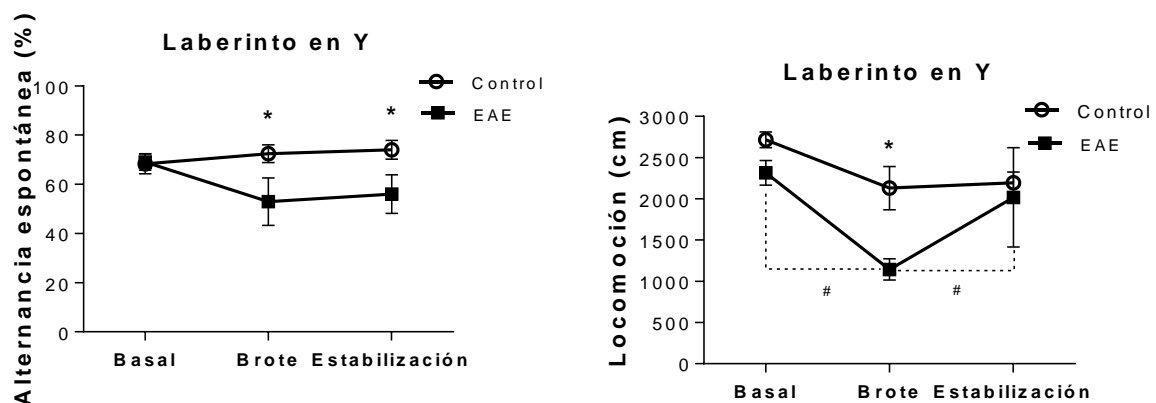


Figura 13. Porcentaje de alternancia espontánea (A) y Locomoción (B), en el test del laberinto en Y. Medias \pm SEM. (A) Se observa una disminución en el porcentaje de alternancia espontánea en los ratones EAE durante las fases de brote y estabilización, (B) y una disminución de la distancia recorrida en la fase de brote. LSD: diferencia entre los grupos (* $p \leq 0,05$), y entre las fases (# $p \leq 0,05$).

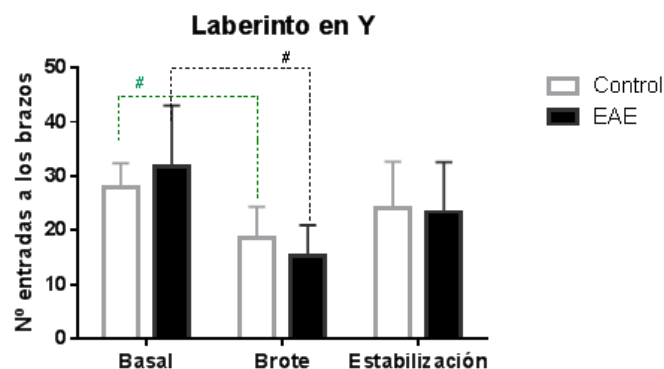


Figura 14. Número de entradas a los brazos del laberinto en Y. Medias \pm SEM. Ambos grupos presentan una disminución en el número de entradas a los brazos durante la fase de brote. LSD: diferencia entre los grupos (* $p \leq 0,05$), y entre las fases (# $p \leq 0,05$).

4.4. Afectación de la memoria espacial a corto plazo en la prueba de reconocimiento de objetos en el grupo EAE

Con respecto a la locomoción en la fase de habituación, el ANOVA de medidas repetidas reveló la existencia de efectos estadísticamente significativos en la variable del tratamiento ($F_{1, 14} = 5,792$; $p \leq 0,05$), así como del día ($F_{2, 28} = 21,834$; $p \leq 0,05$) y de la interacción entre ambas ($F_{2, 28} = 10,743$; $p \leq 0,05$). Los análisis post hoc mostraron que el grupo EAE disminuyó significativamente su locomoción en comparación al grupo control en la fase de estabilización (LSD: $p \leq 0,05$); mientras que hubo una mejora en el grupo control durante la fase de estabilización con respecto a la fase basal y de brote (LSD: $p \leq 0,05$), así como una disminución en el grupo EAE en la fase de brote y una mejora en la fase de estabilización (LSD: $p \leq 0,05$) (Figura 15).

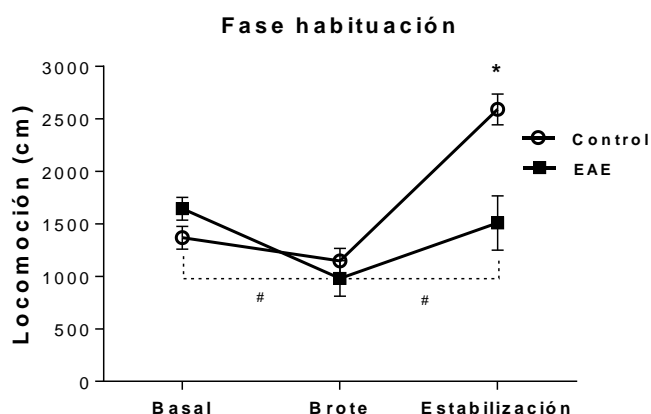


Figura 15. Locomoción en la fase de habituación. Medias \pm SEM. Los ratones EAE disminuyen la distancia total recorrida (locomoción) durante la fase de estabilización, en comparación con los controles. LSD: diferencia entre los grupos (* $p \leq 0,05$), y entre las fases (# $p \leq 0,05$).

En la fase de muestra, el ANOVA de medidas repetidas no mostró un efecto del tratamiento en el tiempo total de exploración de los objetos ($F_{1, 14} = 0,465$; $p \geq 0,05$). Sin embargo, la variable “día” sí mostró un efecto significativo ($F_{2, 28} = 11,394$; $p \leq 0,05$), reduciéndose la exploración tanto en la fase de brote como de estabilización, en comparación con la exploración basal (LSD: $p \leq 0,05$). No se observó un efecto estadísticamente significativo en la interacción entre ambas variables ($F_{2, 28} = 1,323$; $p \geq 0,05$) (Figura 16).

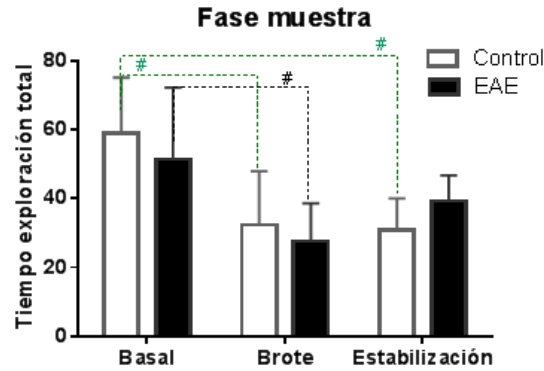


Figura 16. Tiempo de exploración de los objetos en la fase de muestra, en la prueba de reconocimiento de objetos con desplazamiento espacial. Medias \pm SEM. Ambos grupos realizan un mismo tiempo de exploración de los objetos, a pesar de que existen diferencias entre las fases. LSD: diferencia entre los grupos (* $p \leq 0,05$), y entre las fases (# $p \leq 0,05$).

Durante la fase de recuerdo, no se observó una afectación diferencial del tiempo de exploración de los objetos en ambos grupos ($F_{1, 14} = 1,136$; $p \geq 0,30$). No obstante, la exploración fue menor en ambos grupos tanto durante la fase de brote como la fase de estabilización ($F_{2, 28} = 9,797$; $p \leq 0,05$; LSD: $p \leq 0,05$). Tampoco hubo un efecto estadísticamente significativo en la interacción entre ambas variables ($F_{2, 28} = 2,166$; $p \geq 0,05$) (Figura 17).

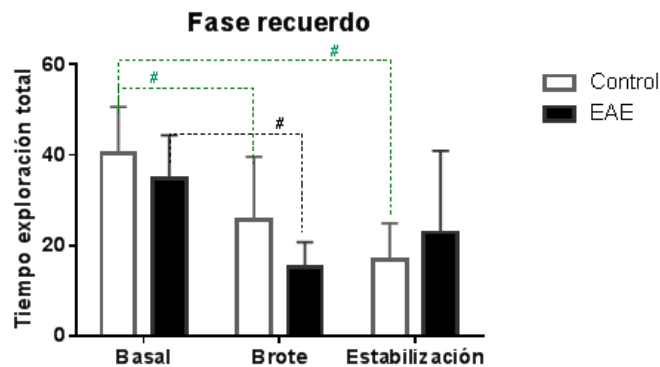


Figura 17. Tiempo de exploración de los objetos en la fase de recuerdo, en la prueba de reconocimiento de objetos con desplazamiento espacial. Medias \pm SEM. Ambos grupos realizan un mismo tiempo de exploración de los objetos, a pesar de que existen diferencias entre las fases. LSD: diferencia entre los grupos (* $p \leq 0,05$), y entre las fases (# $p \leq 0,05$).

Con respecto al índice de discriminación, el ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto estadísticamente significativo de la variable “día” entre las diferentes fases ($F_{2, 28} = 3,612$; $p \leq 0,05$), pero sólo en el grupo EAE (LSD: $p \leq 0,05$). Además, se obtuvo un efecto significativo de la interacción ($F_{2, 28} = 2,896$; $p \leq 0,05$), obteniéndose diferencias significativas entre ambos grupos en la fase de estabilización (LSD: $p \leq 0,05$).

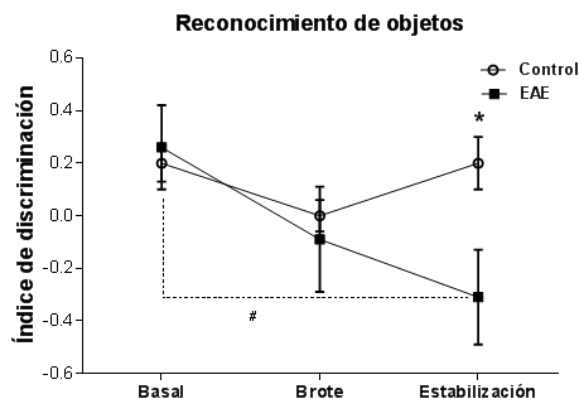


Figura 18. Índice de discriminación en la fase de recuerdo, en la prueba de reconocimiento de objetos con desplazamiento espacial. Medias \pm SEM. LSD: diferencia entre el grupo EAE y control (* $p \leq 0,05$), y entre las fases basal, de brote y de estabilización (# $p \leq 0,05$).

4.5. Incremento del nivel de ansiedad en el grupo EAE en el laberinto elevado en cruz

El ANOVA de medidas repetidas mostró un efecto de tratamiento ($F_{1, 14} = 4,911$; $p \leq 0,05$), ya que los ratones EAE presentaron un menor índice de ansiedad en el laberinto elevado en cruz durante la fase de brote de la enfermedad, en comparación con el grupo control (LSD: $p < 0,05$). Lo cual, esto significa que los ratones mostraron un aumento del nivel de ansiedad. Además, la variable día tuvo un efecto significativo en ambos grupos ($F_{2, 28} = 12,973$; $p \leq 0,05$), siendo menor el índice de ansiedad en la fase de brote y de estabilización, en comparación a la fase basal (LSD: $p \leq 0,05$) (figura 19.a). Sin embargo, no hubo efecto de interacción entre las variables “tratamiento” y “día” ($F_{2, 28} = 1,239$; $p \geq 0,05$).

En cuestión a la locomoción, El ANOVA de medidas repetidas reveló una disminución en los ratones EAE, en comparación a los controles ($F_{1, 14} = 49,148$; $p \leq 0,05$), durante la fase de brote y de estabilización (LSD: $p \leq 0,05$) (Figura 19.b). La variable “día” mostró un efecto significativo ($F_{2, 28} = 19,407$; $p \leq 0,05$) sólo en el grupo EAE, reduciéndose la locomoción en la fase de brote con respecto a la fase basal y a la fase de estabilización (LSD: $p \leq 0,05$). También se observó una interacción estadísticamente significativa ($F_{2, 28} = 18,015$; $p \leq 0,05$) entre ambas variables.

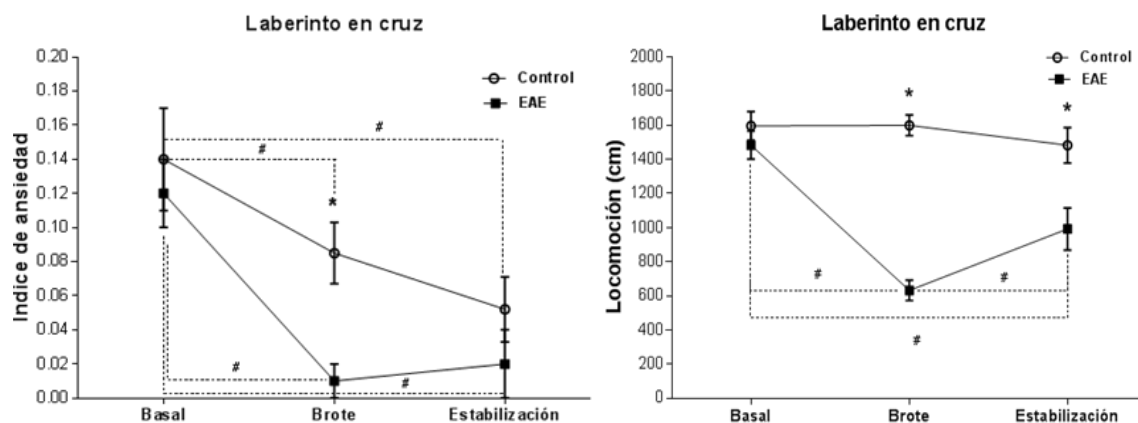


Figura 19. Índice de ansiedad (A) y Distancia total recorrida (locomoción) (B), en el laberinto elevado en cruz. Medias \pm SEM. Los ratones EAE muestran una disminución del índice de ansiedad (aumento del nivel de ansiedad) durante la fase de brote, al igual que disminuyen su locomoción en las fases de brote y de estabilización. LSD: diferencia entre el grupo EAE y control (* $p \leq 0,05$), y entre las fases basal, de brote y de estabilización ($\#p \leq 0,05$).

5. DISCUSIÓN

El objetivo principal de nuestro trabajo, ha sido estudiar la presencia de alteraciones de tipo exploratorio, cognitivo y emocional en ratones con EAE, un modelo animal de EM. A diferencia de otras investigaciones, en las que se han realizado estudios presintomáticos en ausencia de déficits motores (Acharjee et al, 2013; Dutra et al, 2013; Peruga et al, 2011), nosotros nos hemos centrado en estudiar estos déficits durante estadios más avanzados (i.e. fase de brote, remisión y estabilización).

El protocolo de inducción de la EAE empleado en nuestro trabajo, dio como resultado la aparición de un curso remitente-recurrente de la enfermedad, donde se observaron las fases de brote, remisión y estabilización, características de la misma. La enfermedad comienza con una fase presintomática (no analizada en nuestro estudio), acompañada de alteraciones cognitivas y emocionales en ausencia de síntomas motores (Acharjee et al., 2013; Kim et al., 2012; Dutra et al., 2013). Estas alteraciones se asocian con la presencia de infiltraciones de células T (Acharjee et al., 2013; Yang et al., 2013) y con procesos de inflamación periférica (Konsman et al., 2002). A continuación, comienzan a observarse los primeros síntomas clínicos, con la aparición de las alteraciones motoras que caracterizan al primer brote de la enfermedad (fase de brote o también denominada fase temprana), acompañándose de alteraciones cognitivas y emocionales. Esta fase se caracteriza por la presencia de procesos de neuroinflamación,

relacionada con una severa disminución de la plasticidad sináptica (Kim et al, 2012, Olechowski et al., 2009; Dutra et al., 2013).

Durante la fase de estabilización de la enfermedad (también denominada fase tardía), los ratones presentan una estabilización de los síntomas clínicos y una progresión de las alteraciones cognitivas y emocionales. Esta fase y las alteraciones características, se asocian a procesos de neurodegeneración y desmielinización en el que tienen lugar fenómenos de muerte celular en neuronas, interneuronas y astrocitos, principalmente (Ziehn et al., 2010; Ziehn et al., 2012). De esta manera, diferentes mecanismos median los cambios de comportamiento en cada una de las fases de la enfermedad, asociándose los fenómenos inflamatorios a las alteraciones presentes durante las fases iniciales, y los fenómenos neurodegenerativos a las alteraciones producidas en la fase más tardía.

Nuestros resultados indicaron que los ratones con EAE mostraron alteraciones exploratorias, elevados niveles de ansiedad y disfunciones en tareas de memoria espacial de trabajo y a corto plazo, alteraciones que frecuentemente han sido asociadas tanto a la EM (Wallin et al, 2006; Goretti et al, 2014; Tan-Kristanto et al, 2015; Sandry et al, 2014) como a la EAE (Acharjee et al, 2013; Dutra et al, 2013; Peruga et al, 2011).

La discapacidad motora se considera el síntoma más evidente y detectable tanto en la EM como en la EAE, en comparación con los síntomas cognitivos y emocionales (Rodrigues et al., 2011). En este sentido, en la prueba de rotarod, nuestros animales mostraron una afectación en la locomoción, tanto durante la fase brote como en la fase tardía de la enfermedad. Estos resultados obtenidos durante la fase tardía, no pudieron ser contrastados con otros trabajos, ya que sólo tuvimos conocimiento de estudios que evaluaban las alteraciones motoras en estadios menos avanzados (Acharjee et al, 2013; Peruga et al, 2011). Sin embargo, en otras investigaciones los ratones EAE no mostraron afectaciones locomotoras durante la fase de brote (Olechowski et al., 2009; Dutra et al, 2013; Olechowski et al., 2013).

Cuando se observan déficits locomotores en animales con EAE, debe tenerse en cuenta que la discapacidad motora reflejada en la locomoción, pueda ser confundida o influenciada por otro síntoma como la fatiga, tanto en la prueba de rotarod (Acharjee et al, 2013) como en la de campo abierto (Gould et al, 2009). En ese aspecto, la fatiga física y cognitiva constituyen los síntomas que afectan a un 95% de los pacientes con EM (Paul et al, 1998; Genova et al, 2013). Según DeHann, van der Vliet, Hendriks, Heijnen y Dijkstra (2004), la fatiga física podría tener lugar como consecuencia de la pérdida muscular de los ratones EAE. De este modo, no podemos descartar que las alteraciones motoras descritas en nuestro estudio en los ratones

EAE, puedan deberse, o al menos estar influenciadas, por la fatiga física y/o cognitiva. Hasta estos momentos, se carece de estudios sobre la fatiga que nos permitan confirmar o descartar su importancia para explicar nuestros resultados, lo que avala la conveniencia de planificar estudios experimentales que nos permitan conocer en detalle la relación entre la discapacidad motora y la fatiga en los modelos animales de EAE.

A pesar de la relevancia de las alteraciones motoras, actualmente el foco de atención en el estudio de la EAE se dirige mucho más a la sintomatología cognitiva y emocional, ya que suelen padecerla el 65% de los pacientes con EM (Centonze et al., 2010; Steinman, 2001). En este sentido, la afectación de la memoria es la característica cognitiva más comúnmente afectada de todas ellas (Rao et al., 1991; Chiaravalloti y DeLuca, 2008).

En consonancia con los estudios en pacientes clínicos, en nuestro estudio también hemos observado severas alteraciones de la memoria. En concreto, hemos hallado una clara afectación de la memoria espacial de trabajo evaluada en el laberinto en Y en los ratones EAE, tanto durante la fase brote como durante la fase tardía. Estos resultados, son congruentes con los obtenidos en otros estudios que emplearon la prueba del laberinto acuático de Morris (Kim et al., 2012; Dutra et al., 2013). Con el fin de descartar la posible participación de variables motivacionales relacionadas con la exploración en las alteraciones cognitivas, analizamos el número de entradas realizadas a los brazos del laberinto en Y, como un indicador de la motivación exploratoria (Kleen et al, 2006). Los resultados indicaron que la afectación de la memoria de trabajo no estuvo acompañada de una alteración de la motivación exploratoria inducida por la EAE, ya que ambos grupos presentaron el mismo número de entradas a los brazos del laberinto. Estos resultados indicaron que la alteración cognitiva observada en nuestro estudio, no se debía a la alteración concomitante del estado motivacional, sugiriendo la existencia de una afectación primaria de la memoria de trabajo espacial en los animales con EAE.

Por otro lado, estudios recientes realizados en animales con EAE, indican que la memoria de reconocimiento de objetos a corto plazo se encuentra afectada durante la fase de brote (Olechowski et al., 2013), pero no estudian el grado de afectación de la misma en estadios más avanzados de la enfermedad. A diferencia de este trabajo, nosotros hemos estudiado la afectación de la memoria a corto plazo (MCP) en una tarea de desplazamiento de objetos durante la fase temprana y durante la fase de estabilización.

En este sentido, nuestros resultados indicaron que la MCP de tipo espacial, no parecía verse afectada durante la fase inicial de brote, pero se encontró seriamente alterada durante la

fase de estabilización. Que no hayamos observado alteraciones durante la fase de brote, al contrario de lo obtenido por Olechowski et al (2013), podría deberse a diferencias en las dos tareas. En nuestro caso empleamos una tarea de reconocimiento espacial, y en el trabajo de Olechowski, se hizo uso de una tarea de reconocimiento de objetos. Ambos procesos se asocian a circuitos cerebrales diferentes (Ennaceur et al., 1997; Vogel-Ciernia y Wood, 2014), que podrían hallarse afectados de forma diferencial en la EAE. En apoyo a esta hipótesis, LoPresti (2015) observó en ratones EAE alteraciones de la MCP espacial, empleando un laberinto de cuatro brazos, tanto en la fase inicial de brote como en las fases más tardías.

Sin embargo, un efecto inesperado en nuestros resultados, fue la mala ejecución en la tarea de MCP mostrada por los ratones controles, los cuales se igualaron al grupo EAE con un bajo índice de discriminación durante la fase de brote. En ambos grupos se produce una reducción de la exploración total de los objetos, un efecto normal que tiene lugar con la exposición repetida al mismo contexto y a los mismos objetos (Poucet, 1989), siendo mayor la reducción en el grupo EAE. Aunque el diferente grado de exploración de los animales en esta tarea podría dar lugar a mal interpretar los resultados de la MCP, no parece en nuestro experimento que la mala ejecución de ambos grupos, en la tarea de MCP, se deba a déficits exploratorios; ya que de ser así, sería esperable un mayor déficit en los animales EAE que en los controles, debido a su menor grado de exploración de los objetos. Aun cuando no seamos capaces de dar una explicación satisfactoria a estos resultados en la fase de brote, sí parece claro que los ratones EAE presentaron un claro déficit de MCP de tipo espacial durante la fase más tardía de estabilización. No obstante, los ratones EAE durante la fase de estabilización, exploraron preferentemente el objeto no desplazado, indicando la presencia de algún tipo de alteración de memoria espacial a corto plazo.

Con respecto a la prueba del laberinto elevado en cruz, durante la fase de brote los ratones con EAE empleados en nuestro estudio, pasaron menos tiempo en los brazos abiertos que los ratones controles (menor índice de ansiedad), indicando que los ratones EAE mostraban unos niveles de ansiedad más elevados. Estos resultados son congruentes con los obtenidos en el estudio de Peruga *et al.* (2011). Incluso una elevada ansiedad ha sido observada ya antes de aparecer los primeros síntomas, durante la fase pre-sintomática de la enfermedad (Haji et al., 2012; Acharjee et al., 2013). En nuestro estudio, puede observarse que esta elevada ansiedad se mantiene estable incluso durante la fase tardía, si bien es cierto que los animales controles aumentan progresivamente el comportamiento ansioso (reducción del índice de ansiedad), lo que provoca que durante la fase de estabilización no se observen diferencias entre los dos

grupos. No obstante, en el grupo control este incremento de la ansiedad, puede estar reflejando que la exposición repetida a la tarea y al brazo abierto en concreto, incrementa la valencia emocional de tipo negativo/aversivo en estos ratones controles. Esta misma explicación podría servir para los ratones EAE, donde podría haberse incrementado la valencia emocional negativa/aversiva durante la segunda exposición al laberinto elevado en cruz en la fase de brote, y manteniéndose hasta la fase de estabilización.

Con respecto a la locomoción mostrada por los ratones EAE en esta tarea, se observa en general un patrón coincidente con el resto de pruebas comportamentales. En este sentido, los animales con EAE mostraron una reducción importante en la locomoción durante la fase de brote, y a pesar de mantener esta afectación locomotora en la fase de estabilización, ésta fue mucho menor, indicando la existencia de una mejoría significativa de la actividad locomotora durante la fase tardía.

6. CONCLUSIÓN

El estudio presentado en este trabajo fin de grado, constituye un intento de analizar de forma experimental el grado de afectación locomotora, cognitiva y emocional en un modelo animal de EM (i.e. EAE) con un curso remitente-recurrente. Como elemento novedoso, hemos pretendido caracterizar estas alteraciones no sólo durante la fase de brote, sino también durante la fase de estabilización de la enfermedad.

De este modo, hemos comprobado que durante la fase de brote (19-21 días después de la inducción) aparecen: alteraciones motoras (observable preferentemente en el rotarod, pero también en otras tareas como en el laberinto en Y), incremento de la conducta ansiosa (laberinto elevado en cruz) y déficits de memoria espacial de trabajo (laberinto en Y) y a corto plazo (reconocimiento de objetos con desplazamiento espacial). En cambio, durante la fase de estabilización (49-51 días post-inducción), los ratones EAE siguieron mostrando un déficit motor significativo en el rotarod (a pesar de observarse cierta mejoría con respecto a la fase de brote), y un severo déficit de memoria espacial a corto plazo en la prueba de reconocimiento de objetos.

A pesar de que hasta estos momentos existen pocos trabajos publicados interesándose por estudiar los procesos cognitivos y emocionales alterados en modelos animales de EM, pensamos que el desarrollo de estos estudios pueden contribuir al conocimiento de los mecanismos neuropatológicos asociados con la sintomatología cognitiva y emocional, así como al diseño de estudios centrados en el tratamiento de los mismos.

7. REFERENCIAS

- Acharjee, S., Nayani, N., Tsutsui, M., Hill, M. N., Ousman, S. S. & Pittman, Q. J. (2013). Altered cognitive-emotional behavior in early experimental autoimmune encephalitis--cytokine and hormonal correlates. *Brain Behav Immun*, 33, 164-72.
- Amato, M. P., Zipoli, V., Goretti, B., Portaccio, E., De Caro, M. F., Ricchiuti, L., Siracusa, G., Masini, M., Sorbi, S. & Trojano, M. (2006). Benign multiple sclerosis: cognitive, psychological and social aspects in a clinical cohort. *J Neurol*, 253(8), 1054-9.
- Antunes, M. & Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*, 13(2), 93-110.
- Bártulos Iglesias, M., Marzo Sola, M. E., Estrella Ruiz, L. A. & Bravo Anguiano, Y. Epidemiological study of multiple sclerosis in La Rioja. *Neurologia*, 30(9), 552-560.
- Bilsland, J. G., Wheeldon, A., Mead, A., Znamenskiy, P., Almond, S., Waters, K. A., Thakur, M., Beaumont, V., Bonnert, T. P., Heavens, R., Whiting, P., McAllister, G. & Munoz-Sanjuan, I. (2008). Behavioral and neurochemical alterations in mice deficient in anaplastic lymphoma kinase suggest therapeutic potential for psychiatric indications. *Neuropsychopharmacology*, 33, 685-700.
- Brenner, P., Alexanderson, K., Björkenstam, C., Hillert, J., Jokinen, J., Mittendorfer-Rutz, E. & Tinghög, P. (2014). Psychiatric diagnoses, medication and risk for disability pension in multiple sclerosis patients; a population-based register study. *PLoS One*, 9(8):e104165.
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B. V. & Thompson, A. J. (2014). Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*, 83(11), 1022-4.
- Centonze, D., Muzio, L., Rossi, S., Furlan, R., Bernardi, G. & Martino, G. (2010). The link between inflammation, synaptic transmission and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Cell Death Differ*, 17(7), 1083-91.
- Clark, R. E., Zola, S. M. & Squire, L. R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci*, 20(23), 8853-60.
- Compston, A. & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet*, 372(9648), 1502-17.
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K. & Gran, B. (2011). Experimental

- autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, 164(4), 1079-106.
- Chiaravalloti, N. D. & DeLuca, J. (2008). Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Lancet Neurol*, 7(12), 1139-51.
- Dawson, G. R., Crawford, S. P., Collinson, N., Iversen, S. D. & Tricklebank, M. D. (1995). Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)*, 118(3), 316-23.
- DeHaan, A., van der Vliet, M. R., Hendriks, J. J., Heijnen, D. A. & Dijkstra, C. D. (2004). Changes in characteristics of rat skeletal muscle after experimental allergic encephalomyelitis. *Muscle Nerve*, 29(3), 369-75
- DeLuca, L. E., Pikor, N. B., O'Leary, J., Galicia-Rosas, G., Ward, L. A., Defreitas, D., Finlay, T. M., Ousman, S. S., Osborne, L. R. & Gommerman, J. L. (2010). Substrain differences reveal novel disease-modifying gene candidates that alter the clinical course of a rodent model of multiple sclerosis. *J Immunol*, 184(6), 3174-85.
- Dutra, R. C., Moreira, E. L., Alberti, T. B., Marcon, R., Prediger, R. D. & Calixto, J. B. (2013). Spatial reference memory deficits precede motor dysfunction in an experimental autoimmune encephalomyelitis model: the role of kallikrein-kinin system. *Brain Behav Immun*, 33, 90-101.
- Ennaceur, A., Neave, N. & Aggleton, J. P. (1997). Spontaneous object recognition and object location memory in rats: the effects of lesions in the cingulate cortices, the medial prefrontal cortex, the cingulum bundle and the fornix. *Exp Brain Res*. 113(3), 509-19.
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*, 215(2), 244-54.
- Fernández, O., Álvarez-Cermeño, J. C., Arnal-García, C., Arroyo-González, R., Brieva, Ll., Calles-Hernández, M. C., Casanova-Estruch, B., Comabella, M., García-Merino, J. A., Izquierdo, G., Meca-Lallana, J. E., Mendibe-Bilbao, M. M., Muñoz-García, D., Olascoaga, J., Oliva-Nacarino, P., Oreja-Guevara, C., Prieto, J. M., Ramió-Torrentà, Ll., Romero-Pinel, L., Saiz, A., Rodríguez-Antigüedad, A. & Grupo Post-ECTRIMS. (2014). Review of the novelties presented at the 29th Congress of the European

- Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) (II). *Rev Neurol*, 59(7), 269-80.
- Foong, J., Rozewicz, L., Quaghebeur, G., Davie, C. A., Kartsounis, L. D., Thompson, A. J., Miller, D. H. & Ron, M. A. (1997). Executive function in multiple sclerosis. The role of frontal lobe pathology. *Brain*, 120(Pt 1), 15-26.
- García-Díaz, B. & Estivill-Torrús, G. (2008). Modelos de experimentación animal para la investigación en esclerosis múltiple. *Revista Española de Esclerosis Múltiple*, 7, 5-19.
- Genova, H. M., Rajagopalan, V., Deluca, J., Das, A., Binder, A., Arjunan, A., Chiaravalloti, N. & Wylie, G. (2013). Examination of cognitive fatigue in multiple sclerosis using functional magnetic resonance imaging and diffusion tensor imaging. *PLoS One*, 8(11), e78811.
- Gold, R. & Rieckmann, P. (2000). *Pathogenese und Therapie der Multiplen Sklerose*. Bremen: Uni-Med Verlag.
- Goretti, B., Viterbo, R. G., Portaccio, E., Niccolai, C., Hakiki, B., Piscolla, E., Iaffaldano, P., Trojano, M. & Amato, M. P. (2014). Anxiety state affects information processing speed in patients with multiple sclerosis. *Neurol Sci*, 35(4), 559-63.
- Goulart, B. K., Lima, M. N., Farias, C. B., Reolon, G. K., Almeida, V. R., Quevedo, J., Kapczinski, F., Schröder, N. & Roesler, R. (2010). Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience*, 167(4), 969-73.
- Gould, T. D., Dao, D. T. & Kovacsics, C. E. (2009). The open field test. En Gould, T. D. (Ed.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (pp. 1–20). Baltimore: Humana Press.
- Haji, N., Mandolesi, G., Gentile, A., Sacchetti, L., Fresegna, D., Rossi, S., Musella, A., Sepman, H., Motta, C., Studer, V., De Chiara, V., Bernardi, G., Strata, P. & Centonze, D. (2012). TNF- α -mediated anxiety in a mouse model of multiple sclerosis. *Exp Neurol*, 237(2), 296-303.
- Hale, G. & Good, M. (2005). Impaired visuospatial recognition memory but normal object novelty detection and relative familiarity judgments in adult mice expressing the APPswe Alzheimer's disease mutation. *Behav Neurosci*, 119, 884-891.

- Hammer, L. A., Zagon, I. S. & McLaughlin, P. J. (2015). Low Dose Naltrexone Treatment of Established Relapsing-Remitting Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Mult Scler*, 2(136), 2376-0389.
- Hulst, H. E., Schoonheim, M. M., Van Geest, Q., Uitdehaag, B. M., Barkhof, F., Geurts, J. J. (2015). Memory impairment in multiple sclerosis: Relevance of hippocampal activation and hippocampal connectivity. *Mult Scler*, 21(13), 1705-12.
- Jongen, P. J., Ter Horst, A. T. & Brands, A. M. (2012). Cognitive impairment in multiple Sclerosis. *Minerva Med*, 103(2), 73-96.
- Kim do, Y., Hao, J., Liu, R., Turner, G., Shi, F. D. & Rho, J. M. (2012). Inflammation-mediated memory dysfunction and effects of a ketogenic diet in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS One*, 7(5), e35476.
- Kleen, J. K., Sitomer, M. T., Killeen, P. R. & Conrad, C. D. (2006). Chronic stress impairs spatial memory and motivation for reward without disrupting motor ability and motivation to explore. *Behav Neurosci*, 120(4), 842-51.
- Konsman, J. P., Parnet, P. & Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci*, 25(3), 154-9.
- Koritschoner, R. S. & Schweinburg, F. (1925). Induktion von Paralyse und durch Rückenmarksentzündung Immunisierung von Kaninchen mit menschlichem Rückenmarksgewebe. *Z Immunitätsf Exp Therapie*, 42, 217-83.
- Lassmann, H., Brück, W. & Lucchinetti, C. F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*, 17(2), 210-8.
- Lister, R. G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*, 92(2), 180-5.
- Longoni, G., Rocca, M. A., Pagani, E., Riccitelli, G. C., Colombo, B., Rodegher, M., Falini, A., Comi, G. & Filippi, M. (2015). Deficits in memory and visuospatial learning correlate with regional hippocampal atrophy in MS. *Brain Struct Funct*, 220(1), 435-44.
- LoPresti, P. (2015). Glatiramer Acetate Guards Against Rapid Memory Decline During Relapsing-Remitting Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Neurochem Res*, 40(3), 473-9.

- Lovett-Racke, A. E., Yang, Y. & Racke, M. K. (2011). Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis?. *Biochim Biophys Acta*, 1812(2), 246-51.
- Lublin, F. D. & Reingold, S. C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46(4), 907-11.
- Malleret, G., Hen, R., Guillou, J. L., Segu, L. & Buhot, M. C. (1999). 5-HT_{1B} receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. *J Neurosci*, 19(14), 6157-68.
- Mamiya, T. & Ukai, M. (2001). [Gly(14)]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine in vivo. *British journal of pharmacology*, 134(8), 1597-1599.
- Mannara, F., Valente, T., Saura, J., Graus, F., Saiz, A. & Moreno, B. (2012). Passive experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 with MOG: evidence of involvement of B cells. *PLoS One*, 7(12), e52361.
- Marrie, R. A., Cohen, J., Stuve, O., Trojano, M., Sørensen, P. S., Reingold, S., Cutter, G. & Reider, N. (2015). A systematic review of the incidence and prevalence of comorbidity in multiple sclerosis: overview. *Mult Scler*, 21(3), 263-81.
- Martin, R., McFarland, H. F. & McFarlin, D. E. (1992). Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol*, 10, 153-87.
- Maurice, T., Hiramatsu, M., Itoh, J., Kameyama, T., Hasegawa, T. & Nabeshima, T. (1994). Behavioral evidence for a modulating role of sigma ligands in memory processes. I. Attenuation of dizocilpine (MK-801)-induced amnesia. *Brain research*, 647(1), 44-56.
- McCarthy, D. P., Richards, M. H. & Miller, S. D. (2012). Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease. *Methods Mol Biol*, 900, 381-401.
- McFarland, H. F. & Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*, 8(9):913-9.

- McKay, K. A., Kwan, V., Duggan, T. & Tremlett, H. (2015). Risk Factors Associated with the Onset of Relapsing-Remitting and Primary Progressive Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *BioMed Research International*, 2015, 817238.
- Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N. & Ben-Nun, A. (1995). A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*, 25(7), 1951-9.
- Méndez, M., Méndez-López, M., López, L., Aller, M. A., Arias, J., Cimadevilla, J. M. & Arias, J. L. (2008). Spatial memory alterations in three models of hepatic encephalopathy. *Behavioural Brain Research*, 188(1), 32-40.
- Miller, A. E. & Rhoades, R. W. (2012). Treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: current approaches and unmet needs. *Curr Opin Neurol*, 25, S4-10.
- Miller, S. D., Karpus, W. J. & Davidson, T. S. (2007). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.], CHAPTER*, Unit–15.1.
- Milo, R. & Miller, A. (2014). Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev*, 13(4-5), 518-24.
- Mondal, S., Martinson, J. A., Ghosh, S., Watson, R. & Pahan, K. (2012). Protection of Tregs, suppression of Th1 and Th17 cells, and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis by a physically-modified saline. *PLoS One*, 7(12), e51869.
- Muhlert, N., Atzori, M., De Vita, E., Thomas, D. L., Samson, R. S., Wheeler-Kingshott, C. A., Geurts, J. J., Miller, D. H., Thompson, A. J. & Ciccarelli, O. (2014). Memory in multiple sclerosis is linked to glutamate concentration in grey matter regions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 85(8), 833-9.
- Olechowski, C. J., Truong, J. J. & Kerr, B. J. (2009). Neuropathic pain behaviours in a chronic-relapsing model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Pain* 2009, 141 (1-2), 156-64.
- Olechowski, C. J., Tenorio, G., Sauve, Y. & Kerr, B. J. (2013). Changes in nociceptive sensitivity and object recognition in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Exp Neurol*, 241, 113-21.

- Paul, R. H., Beatty, W. W., Schneider, R., Blanco, C. R. & Hames, K. A. (1998). Cognitive and physical fatigue in multiple sclerosis: relations between self-report and objective performance. *Appl Neuropsychol*, 5(3), 143-8.
- Parmenter, B. A., Shucard, J. L. & Shucard, D. W. (2007). Information processing deficits in multiple sclerosis: a matter of complexity. *J Int Neuropsychol Soc*, 13(3), 417-23.
- Paul, R. H., Beatty, W. W., Schneider, R., Blanco, C. & Hames, K. (1998). Impairments of attention in individuals with multiple sclerosis. *Mult Scler*, 4(5), 433-9.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E. & Briley, M. (1985). Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*, 14(3), 149-67.
- Peruga, I., Hartwig, S., Thöne, J., Hovemann, B., Gold, R., Juckel, G. & Linker, R. A. (2011). Inflammation modulates anxiety in an animal model of multiple sclerosis. *Behav Brain Res*, 220(1), 20-9.
- Poucet, B. (1989). Object exploration, habituation, and response to a spatial change in rats following septal or medial frontal cortical damage. *Behav Neurosci*, 103(5), 1009-16.
- Rangachari, M. & Kuchroo, V. K. (2013). Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *J Autoimmun*, 45, 31-9.
- Rao, S. M., St Aubin-Faubert, P. & Leo, G. J. (1989). Information processing speed in patients with multiple sclerosis. *J Clin Exp Neuropsychol*, 11(4), 471-7.
- Rao, S. M., Leo, G. J., Bernardin, L. & Unverzagt, F. (1991). Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. *Neurology*, 41(5), 685-91.
- Rodgers, R. J. (1997). Animal models of 'anxiety': where next?. *Behav Pharmacol*, 8(6-7), 477-96.
- Rodrigues, D. H., Vilela Mde, C., Lacerda-Queiroz, N., Miranda, A. S., Sousa, L. F., Reis, H. J. & Teixeira, A. L. (2011). Behavioral investigation of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arq Neuropsiquiatr*, 69(6), 938-42.
- Rommer, P. S. & Stüve, O. (2013). Management of secondary progressive multiple sclerosis: prophylactic treatment-past, present, and future aspects. *Curr Treat Options Neurol*, 15(3), 241-58.

- Ruarte, M. B., Orofino, A. G. & Alvarez, E. O. (1997). Hippocampal histamine receptors and conflictive exploration in the rat: studies using the elevated asymmetric plus-maze. *Braz J Med Biol Res*, 30(12), 1451-61.
- Sampedro-Piquero, P., Zancada-Menéndez, C., Begega, A., Méndez, M. & Arias, J. L. (2013). Effects of forced exercise on spatial memory and cytochrome c oxidase activity in aged rats. *Brain Research*, 1502, 20-9.
- Sandry, J. & Sumowski, J. F. (2014). Working memory mediates the relationship between intellectual enrichment and long-term memory in multiple sclerosis: an exploratory analysis of cognitive reserve. *J Int Neuropsychol Soc*, 20(8), 868-72.
- Santin, L. J., Bilbao, A., Pedraza, C., Matas-Rico, E., López-Barroso, D., Castilla-Ortega, E., Sánchez-López, J., Riquelme, R., Varela-Nieto, I., de la Villa, P., Suardíaz, M., Chun, J., De Fonseca, F. R. & Estivill-Torrús, G. Behavioral phenotype of maLPA1-null mice: increased anxiety-like behavior and spatial memory deficits. *Genes Brain Behav*, 8(8), 772-84.
- Sarnyai, Z., Sibille, E. L., Pavlides, C., Fenster, R. J., McEwen, B. S. & Toth, M. (2000). Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14731-6.
- Schindler, A. G., Li, B., Chavkin, C. (2010). Behavioral stress may increase the rewarding valence of cocaine associated cues through a dynorphin/kappa opioid receptor mediated mechanism without affecting associative learning or memory retrieval mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, 35, 1932-1942.
- Stefflerl, A., Schubart, A., Storch², M., Amini, A., Mather, I., Lassmann, H. & Linington, C. (2000). Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 165(5), 2859-65.
- Siebert, R. J. & Abernethy, D. A. (2005). Depression in multiple sclerosis: a review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76(4), 469-75.
- Steinman, L. (1996). Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*, 85(3), 299-302.

- Steinman, L. (2001). Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol*, 2(9), 762-764
- Steinman, L. (2007). A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med*, 13(2), 139-45.
- Tan-Kristanto, S. & Kiropoulos, L. A. (2015). Resilience, self-efficacy, coping styles and depressive and anxiety symptoms in those newly diagnosed with multiple sclerosis. *Psychol Health Med*, 20(6), 635-45.
- Tullman, M. J., Oshinsky, R. J., Lublin, F. D. & Cutter, G. R. (2004). Clinical characteristics of progressive relapsing multiple sclerosis. *Mult Scler*, 10(4), 451-4.
- Vogel-Ciernia, A. & Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Curr Protoc Neurosci*, 69, 8.31.1-8.31.17.
- Wallin, M. T., Wilken, J. A. & Kane, R. (2006). Cognitive dysfunction in multiple sclerosis: Assessment, imaging, and risk factors. *J Rehabil Res Dev*, 43(1), 63-72.
- Yang, G., Parkhurst, C. N., Hayes, S. & Gan, W. B. (2013). Peripheral elevation of TNFalpha leads to early synaptic abnormalities in the mouse somatosensory cortex in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(25), 10306-11.
- Ziehn, M. O., Avedisian, A. A., Tiwari-Woodruff, S. & Voskuhl, R. R. (2010). Hippocampal CA1 atrophy and synaptic loss during experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE. *Lab Invest*, 90(5), 774-86
- Ziehn, M. O., Avedisian, A. A., Dervin, S. M., Umeda, E. A., O'Dell, T. J. & Voskuhl, R. R. (2012). Therapeutic testosterone administration preserves excitatory synaptic transmission in the hippocampus during autoimmune demyelinating disease. *J Neurosci*, 32(36), 12312-24.
- Ziemssen, T. (2011). Symptom management in patients with multiple sclerosis. *J Neurol Sci*, 1, S48-52.



ANEXO II

SOLICITUD DE LA DEFENSA Y EVALUACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

CURSO ACADÉMICO 2014/5

Nombre y apellidos del estudiante	Cristina Sánchez Morales
DNI	44653541-F
Grado en Psicología/Logopedia	Grado en Psicología
Universidad o institución de destino ¹	Universidad de Málaga
Título del TFG	Alteraciones motoras, cognitivas y emocionales en la encefalomiелitis autoinmune experimental
Tutor/a de TFG de la UMA	Dr. Luis Javier Santín Núñez
Tutor colaborador externo ¹	
Cotutor ²	
Departamento	Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento
Área de conocimiento	Psicobiología
Idioma utilizado para la defensa	<i>Español</i>
Valoración del tutor ³	FAVORABLE

SOLICITA:

La defensa y evaluación del Trabajo de Fin de Grado que arriba se describe, en la convocatoria de Julio de 2014:

Málaga, a 27 de 11 de 2015

Firma del tutor/a:

Firma del estudiante:

¹ Para los alumnos acogidos a programas de movilidad o que desarrollen el TFG en otra institución.

² En casos excepcionales podrá existir la figura de un cotutor, previa autorización de la Comisión del TFG.

³ Favorable o No favorable



ANEXO IV

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO

CURSO ACADÉMICO 2014/5

Nombre y apellidos del estudiante	Cristina Sánchez Morales
DNI	44653541-F
Universidad o institución de destino ¹	Universidad de Málaga
Título del TFG	Alteraciones motoras, cognitivas y emocionales en la encefalomiелitis autoinmune experimental
Tutor/a de TFG de la UMA	Dr. Luis Javier Santín Núñez
Departamento	Psicobiología y Metodología de las Ciencias del Comportamiento
Área de conocimiento	Psicobiología

DECLARO BAJO JURAMENTO O PROMESA:

Que los documentos presentados son originales e inéditos, no habiéndose utilizado para la evaluación de ninguna otra asignatura del plan de estudios cursado.

Esta declaración se realiza bajo la responsabilidad de quien la suscribe, a los efectos de participar en la Defensa del Trabajo de Fin de Grado.

En Málaga, a 27 de 11 de 2015

Firma del estudiante:

¹ Para los alumnos acogidos a programas de movilidad o que desarrollen el TFG en otra institución.